

DIE AMINOSÄURESEQUENZ DES DURCH
TRYPSIN LIBERIERBAREN SÄURESTABILEN
INHIBITORS AUS RINDERSERUM

Sebastian Thaler

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der HNO - Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H.H. Naumann

Biochem. Labor: Leiter Prof. Dr. K. Hochstraßer

Die Aminosäuresequenz des durch Trypsin liberierbaren
säurestabilen Inhibitors aus Rinderserum



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sebastian Thaler

München 1978



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. Hochstraßer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.1978

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. K. Hochstraßer möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und Unterstützung bei der Durchführung und Ausarbeitung meinen herzlichen Dank aussprechen. Ferner möchte ich mich bei Frau S. Haindl für die stets freundliche Hilfe bei der Versuchsdurchführung herzlich bedanken. Bei Dr. K. Wachter möchte ich mich für die Sequenzierung bedanken.

GLIEDERUNG

A. EINLEITUNG

B. THEORETISCHER TEIL

1. Eigenschaften und Funktion der Proteinaseinhibitoren (PI)
2. Physiologie und Lokalisation der PI
3. Charakteristik des Rindercolostruminhibitors CTI
4. Der I α I als Vorstufe der säurestabilen PI im menschlichen Serum und Urin

C. ERGEBNISSE

D. DISKUSSION

E. ZUSAMMENFASSUNG

F. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Material und Methoden

II. Versuchsdurchführung

G. LITERATURVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG

Jede lebende biologische Zelle benötigt zur Einstellung seiner Stoffwechselfvorgänge ein fein regulierbares Kontrollsystem. Diese Anforderungen erfüllen hochmolekulare Proteine oder Proteide mit der Funktion von Biokatalysatoren, sog. Enzyme.

Für die katalytische Wirksamkeit ist das "aktive Zentrum" verantwortlich, das aus bestimmten Teilen der Polypeptidkette durch eine besondere Faltung entsteht.

Dieses "aktive Zentrum" ist auch der häufigste Angriffspunkt der Enzymhemmstoffe, der Inhibitoren. Sie regulieren die Enzymtätigkeit und schützen das körpereigene Protein vor Autolyse.

Solche Inhibitoren kontrollieren auch die proteolytisch regulierten Prozesse im Blut, wie Blutgerinnung, Kininfreisetzung und Antikörperbildung. Aus diesem Grund erwiesen sich Veränderungen im Proteinaseinhibitoren (PI)-Titer von diagnostischer Bedeutung. Man fand die antitryptische Aktivität bei verschiedenen Prozessen wie metastasierendem Karzinom, akuten Erkrankungen und Entzündungen beträchtlich erhöht (1, 2, 9).

Therapeutisch genützt wird bislang nur der bekannteste und am eingehendsten untersuchte Proteinaseinhibitor, ein Trypsin-Kallikrein Inhibitor aus Rinderorganen. Er heißt auch BPTI (Basic bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) und ist bei uns unter dem Handelsnamen Trasylol^R auf dem Markt (26). Seine therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten reichen derzeit vom anaphylaktischen Schock bis zum Frühstadium einer akuten Pankreatitis und zu bestimmten Gerinnungsstörungen (1, 19, 38).

Über die physiologischen Zusammenhänge zwischen den vielen inzwischen entdeckten Proteinaseinhibitoren ist bisher noch recht wenig bekannt. 1973 konnten Hochstraßer und Mitarbeiter nachweisen, daß die säurestabilen Inhibitoren des Serums in Beziehung zu den Inhibitoren des oberen Respirationstraktes stehen (2, 3).

Da der bereits 1950 von Laskowski jr. im Rindercolostrum gefundene Proteinaseinhibitor in seinen Eigenschaften gewisse Ähnlichkeit mit dem niedermolekularen, säurestabilen Inhibitor des Serums aufweist, war es für uns von Interesse, mögliche Zusammenhänge zu untersuchen (25, 26, 27, 28). Im Zuge der Aufklärung dieser Frage beschäftigt sich diese Arbeit damit, ob der säurestabile, trypsinaktivierte Inhibitor des Rinderserums (TAI) eine Vorstufe des Rindercolostruminhibitors (CTI) ist, oder ob es sich um Inhibitoren völlig verschiedener Herkunft handelt.

B. THEORETISCHER TEIL

1. Eigenschaften und Funktion der Proteinaseinhibitoren (PI)

Bei den PI handelt es sich um Stoffe mit Polypeptidcharakter, die in niedermolekulare Inhibitoren, etwa bis zu einem Molekulargewicht (MW) von 20 000 und in hochmolekulare Inhibitoren (von 20 000 - 160 000) eingeteilt werden. Die niedermolekularen Inhibitoren sind im Gegensatz zu den hochmolekularen säure- und thermostabil.

Das Hemmspektrum ist sehr verschieden. Es gibt streng spezifische Inhibitoren, die nur ein Enzym hemmen können und polyvalente, die mehrere Enzyme zu hemmen vermögen. Die Wirkung eines Inhibitors bezieht sich jeweils auf alle katalytischen Funktionen eines blockierbaren Enzyms. Die physiologische Funktion der Inhibitoren besteht letztlich darin, proteolytische Vorgänge zeitlich und räumlich zu begrenzen und damit die übrigen Möglichkeiten des Organismus zur Steuerung der Wirkung proteolytischer Enzyme zu ergänzen (1).

Die meisten PI sind polyvalent, hemmen also nicht spezifisch nur Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Thrombin ect., sondern mit unterschiedlicher Hemmkapazität zwei oder mehrere Proteinase. Spezifische Trypsininhibitoren können in zwei Klassen eingeteilt werden. Diese Hemmstoffe enthalten in ihren aktiven oder reaktiven Zentren definierte Lysin- oder Argininreste, die für ihre Funktion essentiell sind. Man spricht von sog. Lysin- bzw. Arginininhibitoren. Die Zugehörigkeit eines Inhibitors kann durch Acylierung der Aminogruppen entschieden werden. Lysininhibitoren werden durch Acylierung der ϵ - Aminogruppen der Lysinreste inaktiviert, während Arginininhibitoren ihre volle Aktivität behalten (1, 4, 6).

Die polyvalenten Inhibitoren werden nach Lage und Anzahl der "reaktiven Zentren" in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe besitzt für jedes von ihr hemmbare

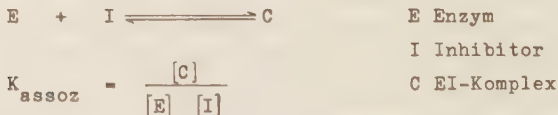
Enzym eigene, nichtüberlappende reaktive Zentren, die zweite Gruppe hemmt mit verschiedenen, aber überlappenden reaktiven Zentren und die dritte Gruppe hemmt verschiedene Enzyme mit einem reaktiven Zentrum (1).

Neben dem Proteinanteil bestehen die PI aus einem, zwischen den einzelnen Arten zum Teil beträchtlich differierendem Kohlenhydratanteil. So sind alle PI des menschlichen Plasmas Glycoproteine mit Kohlenhydratresten von bis zu 35 % des Molekulargewichtes (C1-Inaktivator). Die Hauptbestandteile sind dabei Hexosen, Galactose, Acetylhexosamine und Sialinsäure. Die Funktion der Kohlenhydrate ist noch unbekannt. Durch Behandlung mit Neuraminidase wird zwar die elektrophoretische Beweglichkeit, nicht aber die biologische Aktivität beeinflusst. Man nimmt heute an, daß der Kohlenhydratanteil für den aktiven Transport der Inhibitoren über die Zellmembran notwendig ist (9).

Hemmechanismus (15, 16, 17, 18)

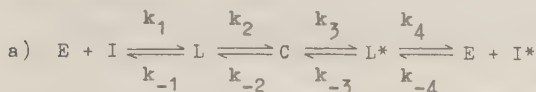
Damit der Inhibitor seine proteolysehemmende Wirkung entfalten kann, muß er mit der zu hemmenden Protease einen Komplex bilden. Dabei lagert sich das "reaktive Zentrum" des Inhibitors reversibel dem "aktiven Zentrum" der Protease an. Die Geschwindigkeit der Komplexbildung findet in der Assoziationskonstanten K_{assoz} Ausdruck und ist ein Maß für die Spezifität des Inhibitors.

K_{assoz} ist der Reziprokwert der Dissoziationskonstanten.



Bei annähernd äquimolaren Verhältnissen läuft die Enzymhemmung nach Finkenstadt (15) über mehrere Zwischenstufen entweder auf einen unveränderten Zerfall des Enzym - Inhibi-

tor - Komplexes hinaus oder der Inhibitor wird an der Peptidbindung im reaktiven Zentrum hydrolysiert.



I (nativer Inhibitor mit intakter Peptidbindung im reaktiven Zentrum)

E (Enzym)

C (Enzym - Inhibitor - Komplex)

L (loser, nonkovalenter Komplex von Enzym und nativem Inhibitor)

I* (Inhibitor mit hydrolysiertem Peptidbindung im reaktiven Zentrum)

L* (loser, nonkovalenter Komplex zwischen E und I*)

Diese vereinfachte Reaktionsgleichung gilt für die meisten Enzym - Inhibitor - Reaktionen.

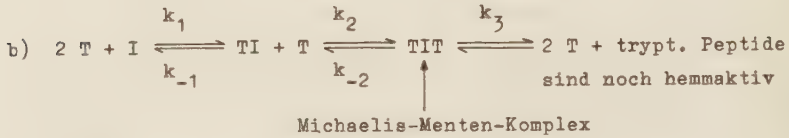
Das Phänomen der zeitlich begrenzten Hemmung ("temporary inhibition") wurde Anfang der fünfziger Jahre von Laskowski sr. entdeckt. Er mischte Pankreas-Trypsin-Inhibitor mit Trypsin und stellte fest, daß zuerst die tryptische Aktivität verschwand und dann schrittweise zurückkehrte. Parallel zum Wiedererscheinen der tryptischen Aktivität fand ein Verlust der Inhibitoraktivität statt. Laskowski postulierte einen vorübergehenden TIT - Komplex (2 Trypsin + Inhibitor).

Man weiß heute, daß das "aktive Zentrum" des ersten Trypsinmoleküls mit dem "reaktiven Zentrum" des Inhibitors reagiert, während das zweite Trypsinmolekül eine Spaltung des Inhibitors an einer anderen Stelle als dem "reaktiven Zentrum" herbeiführt. Um diesen Mechanismus annehmen zu können, mußte die Abänderungsspaltung der Inaktivierungsspaltung vorausgehen.

Die modifizierende Spaltung hat ihr Optimum im Gegensatz zu allen anderen tryptischen Spaltungen im sauren Bereich (pH 3 - 4). In diesem Bereich zerfällt der Komplex mit

dem veränderten Inhibitor deutlich bevorzugt vor dem Komplex mit dem unveränderten Inhibitor.

Bei Trypsinüberschuß gilt folgende Reaktionsgleichung:



Die Geschwindigkeit der Inhibitorhydrolyse durch Trypsin ist umgekehrt proportional zur Anfangskonzentration des Inhibitors. Nur der sekretorische Rinderpankreas-Trypsin-inhibitor (Kazal), BPTI (Kunitz), Rindercolostruminhibitor CTI und ein Plasmainhibitor erwiesen sich als resistent gegen Spaltung durch Trypsin.

2. Physiologie und Vorkommen der PI im Organismus

Proteinaseninhibitoren kommen im tierischen Organismus in allen Organen, Geweben und im Blut vor. Allein der BPTI, der am meisten untersuchte Proteinaseninhibitor, war in fast allen Rindergeweben enthalten. Relativ lange bekannt ist auch, daß das α_1 -Antitrypsin neben organspezifischen niedermolekularen Inhibitoren, in vielen Sekreten enthalten ist. α_1 -A tritt aus der Blutbahn über die schleimbildenden Zellen des Respirationstraktes in das Nasen- bzw. Bronchialsekret über.

Hochstraßer und Mitarbeiter (5, 6, 7, 8, 10) stellten fest, daß menschliches Nasensekret unter physiologischen Bedingungen einen spezifischen, relativ niedermolekularen PI (MW ca. 14 000) mit Hemmwirkung gegen Trypsin, Chymotrysin und Pronase enthält. Die inhibitorische Kapazität entspricht nahezu der des Blutplasmas. Dieser Inhibitor schützt das Flimmerepithel von Nasen- und Nasennebenhöhlen vor dem Angriff proteolytischer Enzyme aus zerfallenden Leukozyten. Bei allen frischen Nasen- und Nasennebenhöhleninfekten wurde eine Erniedrigung des Inhibitorspiegels auf 20 % festgestellt. Während bei chronischen Erkrankungen der Inhibitorgehalt des Sekrets noch um 55 % erniedrigt war.

Die Höhe des Inhibitorspiegels ist offensichtlich vom Funktionszustand der Nasenschleimhaut abhängig und damit ein Maß für Stärke und Verlauf der Krankheit.

Auch das Bronchialsekret enthält neben α_1 -A zwei sog. Arginininhibitoren mit MW von ca. 14 000 und 20 000. Sie bewirken 70 % der Hemmkapazität und werden wahrscheinlich vom Flimmerepithel sezerniert. Diese Inhibitoren scheinen für die Pathophysiologie der Bronchitiden von Bedeutung zu sein. Die proteolytische Aktivität der purulenten Sputen wird auf leukozytäre und bakterielle Proteasen zurückgeführt (10). Den niedermolekularen, säurestabilen Bronchialinhibitoren und dem α_1 -A (zu 30 %) wird eine physiologische Schutzfunktion zugeschrieben (5). Hochstraßer und Mitarbeiter (6) wiesen durch Immunpräzipitat mit Antikörper gegen

den I α I (Inter-alpha-Trypsininhibitor) des Plasmas nach, daß dieser eine Vorstufe der niedermolekularen, säurestabilen Inhibitoren aus dem Bronchial- und Nasensekret ist. Die Inhibitoren unterscheiden sich zwar im MW und in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit, aber beide gehören zur Gruppe der Arg - Inhibitoren und scheinen die gleichen Antigendeterminanten und das gleiche reaktive Zentrum wie der I α I zu besitzen (4, 5, 6, 7). Menschliches Serum enthält mindestens sieben PI: α_1 -Antitrypsin (α_1 -A), α_2 -Macroglobulin (α_2 -M), α_1 -Antichymotrypsin (α_1 -X), Antithrombin III (AT III), I α I, C1 - Inaktivator (C1 INA) und einen niedermolekularen, säurestabilen Trypsininhibitor (I_{34}). Diese Inhibitoren gehören zu einer Gruppe von Proteinen, deren Haupteigenschaft die feste Bindung und damit die Hemmung einer Vielzahl von proteolytischen Enzymen ist (4, 8, 9). Mit Ausnahme des I_{34} unterscheiden sie sich jedoch von den meisten anderen natürlichen PI durch ihr hohes MW (50 000 - 700 000) und ihre streng begrenzte physiologische Funktion. α_1 -A, I α I, α_2 -M und AT III spielen eindeutig eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des hämostatischen Gleichgewichts, da sie wichtige Blutgerinnungsenzyme wie Plasmin und Thrombin hemmen. Daneben sind die meisten Plasma - PI in der Lage, die katalytische Aktivität der Pankreasenzyme Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Kallikrein zu unterbinden. Obwohl diese Enzyme ins Duodenum sezerniert werden, um dort ihre Verdauungsaufgabe zu erfüllen, gelangt doch ein Teil davon auch in die Blutbahn. Die Plasmainhibitoren schützen deshalb vermutlich auch das benachbarte Protein vor dem Abbau durch Pankreasproteasen, die bei Pankreatitis massiv ins Blut gelangen. Vor ungefähr 10 Jahren wurde zum ersten Mal ein α_1 -A - Mangel beim Menschen beschrieben und ein Zusammenhang zwischen homozygotem α_1 -A - Mangel und obstruktivem Lungenemphysem nachgewiesen. Das α_1 -A verhindert die Proteolyse der elastischen Fasern und der Basalmembran in der Lunge durch leukozytäre Proteasen.

Der cervicale Schleim des menschlichen Uterus kann durch proteolytische Enzyme depolymerisiert werden. Die Acrosomen der Spermien und die Samenflüssigkeit enthalten diese Enzyme (14). Es fiel auf, daß der Cervixschleim im fruchtbaren Abschnitt des Zyklus, wo er am leichtesten von Spermien passiert werden kann, die niedrigste Konzentration an PI (α_1 -A, I α I, α_2 -X) und Immunglobulinen aufweist, während nach der Ovulation die PI-Werte signifikant ansteigen. Die Gabe hormoneller Kontrazeptiva ergibt das gleiche Verhaltensmuster. Die PI - Abnahme wird als Östrogeneffekt und der Anstieg der PI - Konzentration als Gestageneffekt angesehen (11, 12, 13).

Andere Autoren wiesen bereits etwas früher durch Versuche an Mäusen und Ratten eine Abhängigkeit der Serum - PI - Konzentration von Testosteron und Nebennierenrindenhormon nach (1).

3. Eigenschaften und Sequenz des CTI

Laskowski jr. (25) konnte 1950 im Rindercolostrum große Mengen eines Trypsininhibitors nachweisen und in kristalliner Form darstellen. Gleichzeitig fand er im menschlichen Colostrum einen Trypsininhibitor, aber wesentlich geringerer Konzentration. Das Molekulargewicht des CTI beträgt ca. 11 000. Er gehört damit zu den niedermolekularen Inhibitoren und ist wie diese säure- und thermostabil. Sein isoelektrischer Punkt liegt bei pH 4,2. Der CTI ist ein polyvalenter PI, der zwar Trypsin und Chymotrypsin hemmt, aber wahrscheinlich nicht Kallikrein.

Der Trypsininhibitor aus dem Rindercolostrum kann durch Ionenaustauscherchromatographie in drei Haupttypen A, B und C aufgelöst werden, wobei peak B stets dominant ist. Genauere Untersuchungen ergaben weitgehende strukturelle Ähnlichkeit dieser Proteine. Der Unterschied in ihrem Verhalten dürfte auf eine unterschiedliche Zusammensetzung des fest gebundenen Kohlenhydratanteils zurückzuführen sein. Die in Abb. 5 angegebene Sequenz stammt vom Inhibitor der quantitativ dominanten B - Gruppe. Das Inhibitormolekül besteht aus einer Polypeptidkette mit 67 Aminosäuren und einem beträchtlichen Kohlenhydratanteil. Für die außerordentliche Stabilität ist die innere Steifheit des Moleküls, hervorgerufen durch drei Disulfidbrücken verantwortlich. Die Aminosäuresequenz, des zur Gruppe der Lysin - Inhibitoren gehörenden CTI ist seit 1969 bekannt. Sie enthält keine Histidin - und Tryptophanreste und das reaktive Zentrum befindet sich am Lysinrest in Position 18 (27, 28).

Bereits 1952 untersuchte Zusammenhänge des CTI mit dem BPTI und dem Kazal - Inhibitor des Pankreas ergaben, daß er mit keinem identisch war (26).

Mittlerweile ist bekannt, daß der CTI mit dem BPTI zwar nicht identisch ist, aber weitgehende Homologien (50 %) und das gleiche reaktive Zentrum besitzt.

Der CTI wird durch Pepsin kaum angegriffen, die Funktion dürfte daher im Schutz der maternellen Immunkörper vor dem tryptischen Abbau bei der Dünndarmpassage bestehen.

4. Der I $\propto$ I als Vorstufe der säurestabilen PI im menschlichen Serum und Urin.

Der I $\propto$ I gehört zu den Spurenproteinen des menschlichen Serums. Seine Konzentration beträgt nach Messungen von Heimbürger nur ca. 50 mg pro 100 ml Serum. (1, 8, 9). Der I $\propto$ I ist ein spezifischer, wenn auch relativ schwacher Trypsininhibitor mit einem Argininrest im reaktiven Zentrum, aber sein Anteil an der gesamten antitryptischen Aktivität des Serums beträgt nur etwa 1 %. Die Angaben über das MW differieren erheblich, sie liegen zwischen 140 000 und 180 000. Diese großen Unterschiede dürften mit der außerordentlichen Labilität des I $\propto$ I und mit seiner geringen Konzentration im Serum zusammenhängen, wodurch eine genaue Bestimmung sehr erschwert wird (31). Im Gegensatz zu den meisten anderen Seruminhibitoren ist bis jetzt über seine physiologische Funktion noch sehr wenig bekannt.

Nach Inkubation eines I $\propto$ I Präparates mit Pankreaskallicrein entstehen immunologisch nachgewiesene, säurestabile und säurelabile Bruchstücke des I $\propto$ I. Das säurestabile Fragment und der schon lange bekannte physiologische säurestabile PI des Serums mit einem errechneten MW von 34 000 sind hinsichtlich ihrer Eigenschaften bei der Immuoelektrophorese identisch. Durch säulenchromatographische Bestimmung wurden jahrelang MW von 44 000 - 70 000 (23, 24) angenommen, erst aus der spezifischen Aktivität errechnet sich der Wert 34 000.

Da bereits früher aufgrund gleicher Aminosäurezusammensetzung, elektrophoretischer Beweglichkeit und ihrer immunologischen Kreuzreaktion die Identität des I - 34 des Serums mit dem säurestabilen Inhibitor des Harns nachgewiesen wurde, schlossen Hochstraßer und Mitarbeiter (4), daß der physiologische säurestabile Seruminhibitor I - 34 das Ergebnis eines begrenzten physiologischen Abbaus des I $\propto$ I im Blutgefäßsystem darstellt. Dieses Enzym, das die begrenzte Proteolyse des I $\propto$ I katalysieren kann und weder

von der Vorstufe, dem $I \propto I$, noch von dem entstehenden säurestabilen I - 34 gehemmt werden kann, ist durch den oben angeführten Versuch im Pankreaskallikrein nachgewiesen worden (33).

Die Identität des Harninhibitors mit dem I - 34 erklärt sich durch dessen unveränderte Ausscheidung in den Nieren. Ein Grund für die Annahme des physiologischen Abbaus des $I \propto I$ liegt auch in der Tatsache, daß derartig hochmolekulare Eiweißkörper nicht unverändert in der Niere ausgeschieden werden können (36, 37).

Der I - 34 ist für verschiedene pathologische Zustände von Bedeutung, wo sein Spiegel, wie z.B. bei verschiedenen Nephropathien beträchtlich ansteigen kann (2, 3, 29, 30). Solche Sera wurden auch zum Nachweis des I - 34 benützt, weil dieser hier nicht angereichert werden mußte. Nach Enteiweißung von Blutplasma verbleiben bis zu 3 % der insgesamt vorhandenen hohen antiproteolytischen Aktivität im Überstand. Diese Restaktivität ist auf den säurestabilen I - 34 zurückzuführen (2, 3, 32).

Die antitryptische Aktivität im Enteiweißungsüberstand erhöht sich nach Inkubation des Serums mit Trypsin. Die Höhe der so freilegbaren Aktivität hängt von der $I \propto I$ - Konzentration des Serums ab. Um dies zu beweisen, inkubierten Hochstraßer und Mitarbeiter neben frischem Humanserum auch ein partiell gereinigtes $I \propto I$ - Präparat, das frei von anderen PI war, mit Trypsin. Da Trypsin im nativen Serum durch große Mengen PI gehemmt wird (1 ml Humanserum inaktiviert bis zu 2000 mU Trypsin), wurde die antitryptische Aktivität des Serums und des $I \propto I$ - Präparates durch steigende Mengen Trypsin bis zum Enzymüberschuß titriert (32).

Die Mischungen wurden inkubiert und nach und nach enteiweißt. In den Überständen wurde die antitryptische Aktivität bestimmt. Es konnte so nachgewiesen werden, daß die säurestabile Aktivität in den Proben mit teilweise inaktivierten

Seruminhibitoren die gleiche ist, wie die, die im nativen Serum gefunden wurde. Proben mit Trypsinüberschuß zeigten einen Anstieg der säurestabilen antitryptischen Aktivität.

Dieses Ergebnis zeigte, daß durch Trypsineinwirkung aus einem säurelabilen Proinhibitor ein säurestabiler Trypsin-inhibitor abgespalten wird. Die Freisetzung des säurestabilen Inhibitors wurde auch in Mischungen ohne völlige Inaktivierung der Serum PI beobachtet, allerdings nach verlängerter Inkubationszeit.

Das Elutionsvolumen der freigesetzten antitryptischen Aktivität entspricht einem MW von 22 000, aber für den gereinigten, durch Trypsin freigesetzten Inhibitor wurde eine spezifische Aktivität von 1400 mIU pro mg Protein gemessen. Aus diesem Ergebnis konnte ein MW von maximal 17 000 errechnet werden (spez. Akt. = MW Trypsin/MW Inhibitor). Das durch Gelfiltration erhaltene MW von 22 000 dürfte auf den Kohlenhydratanteil dieses Inhibitors (I-17) zurückzuführen sein.

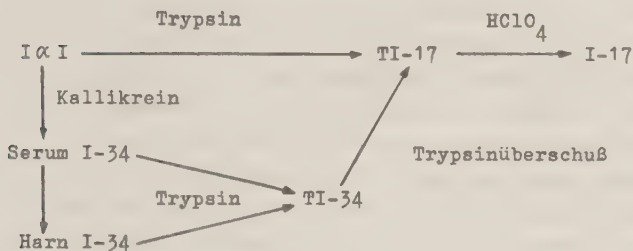
Der I $\propto$ I wird durch Trypsininkubation nicht direkt in den I-17 umgewandelt, sondern bildet als Zwischenstufe einen relativ beständigen Trypsin-Inhibitor-Komplex TI-17, mit einem MW von ca. 40 000. Nach Enteiweißung mit Perchlorsäure, wodurch Trypsin sowie der säurelabile Teil des Inhibitors ausgefällt werden, verbleibt der niedermolekulare säurestabile I-17 im Überstand. Die identischen I-17 Inhibitoren aus dem I $\propto$ I - Präparat, sowie aus dem frischen Serum sind ohne Zweifel Derivate des I $\propto$ I, freigesetzt durch unphysiologische Enzymeinwirkung.

Trypsin bildet auch mit einem leichten Überschuß an I-34 einen Komplex TI-34 (32, 35). Der I-34 kann aus dem Komplex durch HClO_4 ohne Veränderung am MW wieder freigesetzt werden. Wird der I-34 jedoch mit einem Überschuß an Trypsin angesetzt, so entsteht ein Komplex mit der elektrophoretischen Beweglichkeit des TI-17. Auch aus diesem Komplex kann durch

Eiweißfällung der I-17 freigesetzt werden.

Damit war nachgewiesen, daß nicht nur der $I \propto I$ durch Trypsineinwirkung in einen Inhibitor mit dem MW von 17 000 umgewandelt werden kann, sondern auch der physiologische säurestabile Serum und Harn I-34.

Es überraschte deshalb auch nicht, daß sich sowohl I-17 wie I-34 als Arginininhibitoren wie der Precursor $I \propto I$ erwiesen.



Aus der Übersicht ergibt sich:

Kallikrein spaltet in vivo aus dem $I \propto I$ den I-34 ab, während Trypsin in einer unphysiologischen Reaktion aus dem $I \propto I$ sowie aus dem I-34 aus Serum und Harn den I-17 freisetzt.

Hochstraßer und Mitarbeiter wiesen durch immunologische Kreuzreaktion untereinander und mit dem $I \propto I$ des Serums nach, daß der $I \propto I$ nicht nur die Vorstufe des I-34, sondern auch des I-17 ist. Hierbei handelt es sich interessanterweise um den ersten Fall, wo aus einem spezifischen und relativ schwach hemmenden Proinhibitor stark hemmende und polyvalente Inhibitorformen entstehen. I-34 und I-17 hemmen nicht nur Trypsin stark, sondern auch Chymotrypsin und Plasmin.

Es war deshalb von Interesse nachzuprüfen, ob im Rinderseum ebenfalls ein trypsinaktivierbares Proinhibitor - Inhibitor - System vorhanden ist.

C. ERGEBNISSE

1. Isolierung des säurestabilen Trypsininhibitors (TI)

Aus frischem Rinderserum wurden durch Perchlorsäure alle säurelabilen Proteine ausgefällt und abzentrifugiert. Der im Überstand befindliche säurestabile TI wurde durch Gelfiltration auf Sephadex G 75 gereinigt und anschließend entsalzt und konzentriert. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes dieses physiologischen, säurestabilen TI im Rinderserum wurde das gereinigte und eingeengte Eluat auf eine geeichte Sephadex G 75-Säule aufgetragen (Abb. 6 Elutionskurve der Eichsubstanzen). Das antitryptische Aktivitätsmaximum des physiologischen TI lag bei einem Elutionsvolumen von 540 ml (Elutionskurve siehe Abb. 1). Auf der Eichkurve (Abb. 2) wurde diesem Inhibitor ein Molekulargewicht von ca. 39 000 zugeordnet. (Erstellung der Eichkurve siehe Abschnitt Versuchsdurchführung).

2. Freisetzung und Isolierung des Trypsin aktivierten Inhibitors aus Rinderserum (TAI)

Aus dem ausgefällten Serumprotein (es enthält den säurelabilen I $\propto$ I) wurde durch Inkubation mit Trypsin im Überschuß ein niedermolekularer, säurestabiler Trypsininhibitor freigesetzt. Die Reaktion wurde durch Perchlorsäure gestoppt und der Niederschlag abzentrifugiert. Durch Trypsinhemmtest wurde die freigelegte antitryptische Aktivität im Überstand bestimmt. Nach dem Entweißen wurde der Überstand, der den freigesetzten Inhibitor enthielt, neutralisiert, eingeengt und durch Gelfiltration auf Sephadex G 75 gereinigt. Anschließend wurde die Lösung entsalzt und auf ca. 400 ml konzentriert. Die darin enthaltene antitryptische Gesamtaktivität betrug etwa 360 000 mIU.

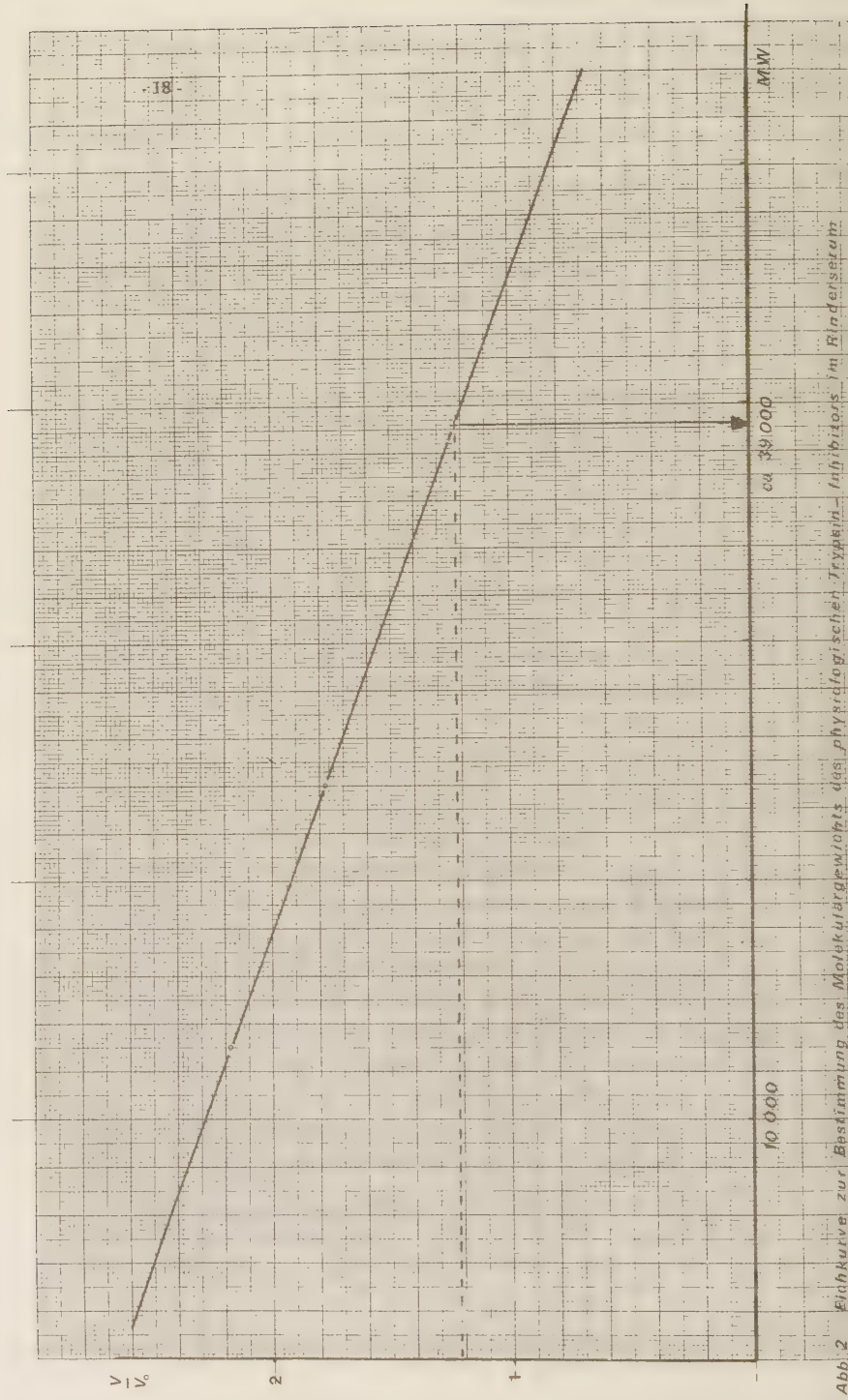


Abb. 2. Eichkurve zur Bestimmung des Molekulargewichts des physiologischen Trypsin-Inhibitors im Rinderserum

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes des TAI wurde ein Bruchteil der inhibitorhaltigen Substanz in Elutionspuffer gelöst und auf die geeichte Filtersäule aufgetragen. Das antitryptische Aktivitätsmaximum des TAI (siehe Abb. 3) lag bei einem Elutionsvolumen von 800 ml. In der Eichkurve (Abb. 4) konnte dem TAI ein MW von ca. 22 000 zugeordnet werden.

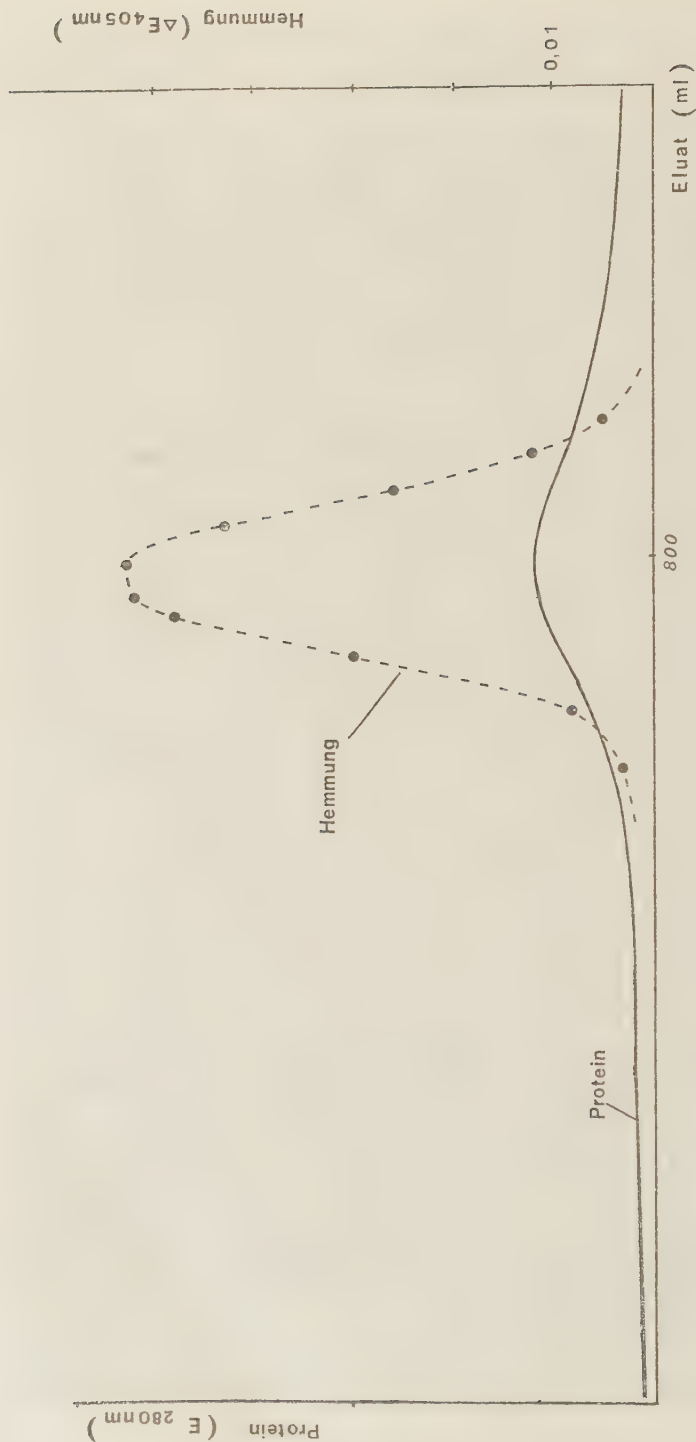
3. Aminosäurezusammensetzung und Sequenz des TAI

Da beim Rind durch die beschriebenen Freilegungsversuch das gleiche Proinhibitor- Inhibitor- System wie im menschlichen Serum nachgewiesen werden konnte, war die Sequenzierung des TAI von höchstem Interesse, um weitere Vergleiche zu ermöglichen.

Nach der Zerstörung der Tertiärstruktur des TAI und Reduktion der Schwefelreste am Cystein wurden diese carboxymethyliert, um eine Restitution zu verhindern. Jetzt war es möglich, den Trypsininhibitor tryptisch zu spalten. Die tryptischen Peptide wurden auf einer Ionenaustauschersäule durch einen Puffergradienten nach basischen und sauren Peptiden aufgetrennt.

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der verschiedenen Peptide wurde nach saurer Hydrolyse nach bekannten Methoden am Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aufstellung der in den einzelnen Peptiden enthaltenen Aminosäuren befindet sich in den Tabellen 1 - 4. Die Tabellen 1 und 2 enthalten die experimentellen Werte, während die Ergebnisse in den Tabellen 3 und 4 auf ganze Zahlen gerundet sind. Die Werte sind relative Molmengen, bezogen auf Arginin oder Lysin.

Tabelle 5 enthält die Aminosäuresequenz der einzelnen Peptide. Die vorläufige, noch nicht restlos gesicherte Gesamtsequenz des doppelköpfigen Trypsininhibitors TAI (Domain I und II) ist in Abb. 5 dargestellt. Der N - Terminus dieses Inhibitors befindet sich am Lysinrest am Anfang von Domain I.



Elutionskurve des TAI



10 000

ca 20 000

MW

Abb. 4 Eichkurve zur Bestimmung des Molekulargewichts des Trypsin aktivierten Hinderinhibitors (TAI)

Aminosäure	RT VIII-1	RT III-1	RT V	RT II	RT IV	RT VI	RT XI-3	RT X-2	RT X-1	RT VIII-3
CM-Cys	1,40	1,17	1,23			0,99	0,99	1,43	1,78	1,95
Asp	1,29			2,66			1,04		3,61	
Thr	0,86								2,05	1,10
Ser			1,04		1,06			2,06	2,44	
Glu	2,09				1,02	0,99	2,98	2,16	2,93	2,24
Pro	2,02						0,84	1,13		
Gly	1,44		1,63	1,96			1,63	2,32	4,26	
Ala	1,13									
Val	1,43	0,79					0,78	1,11		
Met										
Ile	0,56						0,73			
Leu	1,33						1,43	2,84	2,15	1,00
Tyr			0,75		1,00		0,91	1,00	1,99	
Phe			0,75		1,00			1,02	1,78	
Lys			1,00	1,00	1,00	1,00		1,00		
Arg	1,00	1,00					1,00		0,67	1,00

Tabelle 1 Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide des TAL (experimentell)

Aminosäure	RCP 67-115	RCP 59-88	RCP 67-11	RCP 46
CM - Cys	1,94	2,33	0,84	1,89
Asp	2,24	2,94	1,20	2,55
Thr				2,19
Ser	1,86	1,66		1,61
Glu	2,38	5,00		2,84
Pro	1,22	0,84		
Gly	2,16	4,48	1,37	2,80
Ala	1,13	1,08	2,18	1,28
Val			1,78	
Met				
Ile		0,80		
Leu	2,95	1,93		1,98
Tyr	1,05	2,91		2,69
Phe	0,97	1,38	1,01	2,20
Lys	1,00	3,10	2,12	1,16
Arg		1,00	1,00	1,00

Tabellle 2 Aminosäurezusammensetzung der citraconylierten Peptide (experimentell)

Aminosäure	RT VIII-1	RT III-1	RT V	RT II	RT IV	RT VI	RT XI-3	RT X-2	RT X-1	RT VIII-3
CM-Cys	2	1	1			1	1	2	2	2
Asp	1			2			1	2	4	
Thr	1								2	1
Ser			1		1			2	2	
Glu	2				1	1	3	2	3	2
Pro	2						1	1		
Gly	1		2	2			2	2	4	
Ala	1						1	1		
Val	2	1								
Met										
Ile	1						1			
Leu	1						2	3	2	1
Tyr			1		1		1	1	2	
Phe			1		1			1	1	
Lys			1	1	1	1		2	1	
Arg	1	1					1			1

46

RCP

67-11

RCP

59-88

RCP

67-115

RCP

Aminosäure

CM-Cys

Asp

Thr

Ser

Glu

Pro

Gly

Ala

Val

Met

Ile

Leu

Tyr

Phe

Lys

Arg

1

1

2

5

1

1

2

2

2

1

2

3

1

2

1

2

3

2

3

3

1

2

2

3

2

1

1

Tabelle 4

Aminosäurezusammensetzung der citr.conylierten Peptide

Peptid *Aminosäuresequenz*

RT VIII-1 Thr Val Glu Ala Cys Asn Leu Pro Jle Val Glu Gly Pro Cys Arg

RT III-1 Cys Val Arg

RT V Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Lys

RT II Gly Asn Gly Asp Lys

RT IV Phe Tyr Ser Glu Lys

RT VI Glu Cys Lys

RT XI-3 Glu Tyr Cys Gly Jle Pro Gly Gly Ala Asp Glu Arg Leu Jle

RT X-2 Lys Ala Asp Ser Cys Glu Leu Asp Tyr Ser Glu Gly Pro Cys Leu Gly Leu Phe Lys

RT X-1 Tyr Phe Tyr Asp Gly Thr Ser Met Ala Cys Glu Thr Phe Leu Thr Gly Cys Met Gly Glu Leu Asp Lys

RT VIII-3 Glu Cys Leu Glu Thr Cys Arg

RCP-67-115 Lys Ala Asp Ser Cys Gln Leu Asp Thr Ser Glu Gly Pro Cys Leu Gly Leu Phe

RCP-59-88 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Lys Glu Tyr Cys Gly Jle Pro Gly Gly Ala Asp Glu Arg Leu Jle

RCP-67-11 Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Arg

RCP-46 Tyr Phe Tyr Asp Gly Thr Ser Met Ala Cys Glu Thr Phe Leu Thr Gly Cys Met Gly Glu Leu Asp Lys
(Glu, Tyr, Ser, Asp, Arg)

Tabelle 5 Aminosäuresequenzen der Peptide des TAL. (Domain I und II)

Die Aminosäuresequenzen wurden von Prof. Dr.K. Hochstraßer in Zusammenarbeit mit Dr. K.Wachter ermittelt.

D. DISKUSSION

Der von Hochstraßer (32) aus Humanserum durch Trypsin freigelegte I - 17 erwies sich als doppelköpfiger Inhibitor vom Kunitztyp (39) und wies weitgehende Homologien mit den Kunitzinhibitoren Trasylol^R (BPTI), Rindercolostruminhibitor CTI, sowie Trypsininhibitoren aus Schnecken und Seeanemonen auf.

Es drängte sich die Frage auf, ob dieser, aus Humanserum freigelegte Kunitzinhibitor einen Einzelfall darstellt. Es war für uns deshalb interessant, die Sequenz des entsprechenden Rinderseruminhibitors TAI zu ermitteln. Das vorläufige Ergebnis bestätigte bereits die Vermutung, daß es sich auch hierbei um einen Inhibitor vom Kunitztyp handelt.

Da beim Rind bereits zwei Kunitztypinhibitoren (Trasylol und CTI) bekannt waren, wurde auch die Frage untersucht, ob es sich beim TAI möglicherweise um eine Vorstufe dieser beiden niedermolekularen Kunitzinhibitoren handelt. Das Ergebnis der Sequenzierung erbrachte jedoch keine Bestätigung dieser Vermutung. (siehe dazu Abb. 5).

Beim TAI handelt es sich trotz weitgehender Homologien mit Trasylol und CTI offensichtlich um eine neue genetische Variante, die nicht mit den beiden anderen Kunitzinhibitoren vom Rind in Zusammenhang steht.

Der Vergleich des TAI mit dem I - 17 (39) ergab dagegen nur geringfügige Sequenzunterschiede.

Trasylol	Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Tyr Gly Pro Cys Lys Ala Arg Ile Ile Arg Tyr
CTI	Phe Gln Thr Pro Pro Asp Leu Cys Gln Leu Pro Gln Ala Arg Gly Pro Cys Lys Ala Ala Leu Leu Arg Tyr
Domain I	Lys Ala Asp Ser Cys Glu Leu Asp Tyr Ser Glu Gly Pro Cys Leu Gly Leu Phe Lys Tyr
Domain II	Thr Val Glu Ala Cys Asn Leu Pro Ile Val Glu Gly Pro Cys Arg
Trasylol	Phe Tyr Asp Ala Lys Ala Gly Leu Cys Glu Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys
CTI	Phe Tyr Asx Ser Thr Ser Asn Ala Cys Glu Pro Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Asn Asx Asn Phe Glu
Domain I	Phe Tyr Asp Gly Thr Ser Met Ala Cys Glu Thr Phe Leu Gly Gly Cys Met Gly Glu Leu Asp Lys (Glu, Ser)
Domain II	Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Arg Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Lys Gly Asn Gly Asp Lys Phe Tyr
Trasylol	Ser Ala Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
CTI	Thr Thr Glu Met Cys Leu Arg Ile Cys Glu Pro Pro Gln Glu Thr Asp Lys Ser
Domain I	Asp, Tyr, Arg) Glu Cys Leu Glu Tyr Cys Arg
Domain II	Ser Glu Lys Glu Cys Lys Glu Tyr Cys Gly Ile Pro Gly Glu Ala Asp Arg Leu Leu

Abb. 5 Sequenzvergleich des TAI (Domain I und II) mit den bekannten Rindertrypsininhibitoren Trasylol und CTI

E. ZUSAMMENFASSUNG

Nach Enteiweißung von frischem Rinderserum verbleibt im Überstand eine geringe antitryptische Aktivität. Diese antitryptische Aktivität geht von einem physiologischen, säurestabilen Trypsininhibitor aus, dem aufgrund seines Elutionsvolumens ein Molekulargewicht von 39 000 zugeordnet wurde.

Aus dem ausgefällten Protein (es enthält den I $\propto$ I) und aus dem physiologischen, säurestabilen Trypsininhibitor des Serums wurden durch Inkubation mit Trypsin im Überschuß ein niedermolekularer, säurestabiler Trypsininhibitor (TAI) mit einem Molekulargewicht von 22 000 freigelegt.

Nach tryptischer Spaltung des TAI wurde die Aminosäurezusammensetzung seiner Peptide bestimmt. Die Sequenzierung ergab einen doppelköpfigen Inhibitor vom Kunitztyp, der weitgehend dem aus Humanserum freigelegten I - 17 ähnelt.

Die Vermutung, daß es sich beim TAI um einen Proinhibitor, der bereits bekannten Rinderinhibitoren vom Kunitztyp Trasylol und CTI handeln könnte, bestätigte sich nicht. Trotz weitgehender Homologien der Sequenzen besteht keine strukturelle Identität zwischen dem TAI und Trasylol und CTI.

F. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Material und Methoden

Rindertrypsin und mit TPCK behandeltes Rindertrypsin, sowie $N\alpha$ - Benzoyl - D, L - Arginin - 4 - p nitro-anilid (BAPA) waren von der Fa. Merck, Darmstadt. CNBr - aktivierte Sepharose 4B von der Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala. Ninhydrin - Reagenz wurde hergestellt aus: 40 g Ninhydrin, 500 ml Natriumacetat - Puffer, 1,5 l Äthylenglykolmonomethyläther, 800 mg $SnCl_2$ unter N_2 - Zufuhr gelöst.

1. Gelfiltration

Das in den zylindrischen Glassäulen 4 x 130 cm aufgeschlämmte Gel Sephadex - G - 75 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) wirkt als Molekularsieb. Große Moleküle werden schneller eluiert, je kleiner das Molekül, umso länger bleibt es in der Säule. Als Elutionspuffer wurde 0,05 m Natriumtetraborat + 0,2 m Na Cl bei pH 8 verwendet.

Das in Elutionspuffer gelöste Material wurde in Proben zu jeweils 50 ml auf die Säulen aufgetragen. Nach dem Einsickern in das Gel wurde die Glaswand mit 10 ml Puffer nachgespült, um zu starkes auseinanderziehen der aktiven Hemmsubstanz auf der Säule zu vermeiden. Nach einem Vorlauf von 300 ml (Säulenvolumen V_0 ca. 400 ml) wurden die Sephadex - Säulen mit dem Durchlaufphotometer (LKB Uvicord) und dem Fraktomat (LKB 7000 Ultrorac) durch dünne Kunststoffschläuche verbunden. Die Trennzeit auf den Säulen betrug mit der anschließenden Spülung des Gels mit Elutionspuffer ca. 6 Stunden pro Probe.

2. Ultrafiltration

Zur partiellen Entsalzung und Einengung der Eluate

wird das Material in Druckdialysekammern mit eingebautem Magnetrührer eingebracht. Das Fassungsvermögen beträgt 350 ml. Als Filter dient eine salz- und wasserdurchlässige Membran (Amicon UM 2). Die Lösung wird mit Stickstoff unter 5 bar Druck und unter Rühren ca. 6 Stunden eingeengt.

3. Trypsinhemmtest (34)

Die in einer Probe enthaltene Inhibitormenge ermittelt man, indem zu einer bestimmten Menge Trypsin so viel inhibitorhaltige Lösung zugegeben wird, daß 50 Prozent des Enzyms gehemmt werden, weil in diesem Bereich die Hemmung linearen Charakter aufweist. Das freie Enzym spaltet aus dem zugegebenen Modellsubstrat $N\alpha$ - Benzoyl - D, L - Arginin - 4 - p - nitroanilid (BAPA) einen Farbstoff - Paranitroanilin - ab. Die Konzentration dieses Farbstoffes bewirkt im Photometer bei 405 nm eine entsprechende Extinktionsänderung E. Diese Extinktionsänderung wird zu einem sog. Leerwert, d.h. der ungehemmten Trypsineinwirkung auf BAPA in Relation gesetzt. Für konstante Mengen eingesetzten Trypsins und Substrates erhält man eine konstante Extinktionsänderung pro Zeiteinheit.

Zur Messung wurde ein Eppendorf Photometer mit einem Filter für die Wellenlänge 405 nm benützt.

In die 3 ml Glasküvetten (Schichtdicke 1 cm) kamen zur Bestimmung des Leerwertes 0,2 ml Trypsinlösung, 1,8 ml Triäthanolaminpuffer, 0,2 m pH 7,8 und 1 ml BAPA Lösung.

Es wurde bei einer Temperatur von 25 °C inkubiert und über einen Zeitraum von 3 Minuten nach jeder Minute die Extinktionsänderung abgelesen.

Im Testansatz kam noch 0,05 - 0,4 ml Inhibitorlösung dazu. Sie wurde mit Triäthanolaminpuffer auf 1,8 ml ergänzt und eine Minute mit 0,2 ml Trypsinlösung bei 25 °C inkubiert, ehe 1 ml BAPA hinzupipettiert wurde. Eine Inhibitormilliunit (mIU) ist diejenige Inhibitormenge, die 1 mU Trypsin zu hemmen vermag.

II. Versuchsdurchführung

1. Isolierung des säurestabilen Trypsininhibitors

40 Liter Rinderserum (RS) wurden unter Rühren mit 70 ml 70 % iger Perchlorsäure (HClO_4) pro Liter enteiweißt und anschließend 20 Minuten mit 3000 RPM zentrifugiert.

Überstand und Sediment wurden getrennt und unterschiedlich weiterbehandelt.

Der Überstand (natives Serum) enthält den physiologischen säurestabilen Trypsininhibitor (TI). Zunächst wurde der stark saure Überstand mit konzentrierter KOH (4 n) auf pH 6 titriert. Anschließend wurde im Unterdruck - Rotationsverdampfer die Lösung auf ca. 2 l eingeeengt. Durch die starke Konzentration fiel dabei bereits ein großer Teil des Salzes (KCl) aus. Das ausgefallene KCl wurde abfiltriert und das Eluat auf einer Biogel p - 2 - Säule 5 x 35 cm mit aqua dest. als Elutionspuffer weiter entsalzt.

Das salzfreie native Rinderserum verteilte der Fraktomat auf einzelne Reagenzgläser mit jeweils ca. 10 ml Eluat.

Durch Austesten des Glasinhaltes der Fraktionen im Trypsinhemmtest konnte der physiologische säurestabile Rindertrypsininhibitor lokalisiert und durch Probe mit Silbernitrat (AgNO_3) vom Salz abgegrenzt werden.

Die salzfreien Glasinhalte mit ausreichender Hemmaktivität gegen Trypsin wurden in 2 l Rundkolben vereinigt. In einem Methanolbad, das mit Trockeneis abgekühlt wurde, froren wir den Inhalt der Rundkolben unter Drehen als gleichmäßig dicke Schicht an der Glaswand ein. Zum Gefriertrocknen wurden die Kolben 2 Tage an eine Lyophilisieranlage gehängt.

Wir erhielten ca. 30 mg Trockensubstanz. Diese lösten

wir in 100 ml Elutionspuffer mit pH 8 (0,05 m Natrium-tetraborat und 0,2 m NaCl) und trugen die Lösung zum Reinigen und Auftrennen in verschiedene Proteinfraktionen auf ein Molekularsieb - Sephadex G 75 - auf.

Das Eluat wurde im Uvicord mit Schreiber durch Absorptionsspektrometrie bei 280 nm laufend auf den Proteingehalt geprüft und anschließend durch einen Fraktomaten auf Reagenzgläser verteilt (ca. 10 ml pro Glas).

Durch Trypsinhemmtest (eingesetzte Testmenge 100 μ l) wurde der Inhibitor wieder lokalisiert und durch Druckdialyse auf 20 ml eingeengt. Durch Trypsinhemmtest mit der abgetrennten Flüssigkeit wurde auch die ordnungsgemäße Funktion der Membran nachgeprüft.

Das gereinigte und eingeengte Eluat wurde auf eine geeichte Sephadex G 75 - Säule aufgetragen und über eine vorher angefertigte Eichkurve das MW des säurestabilen TI im Rinderserum bestimmt. Es beträgt ca. 39 000.

Eichung der Sephadex G 75 - Säule

Zur Bestimmung des Innenvolumens V_0 der Säule wurde Dextranblau benützt, eine hochmolekulare Substanz, die vom verwendeten Molekularsieb Sephadex G 75 praktisch ungehindert durchgelassen wird.

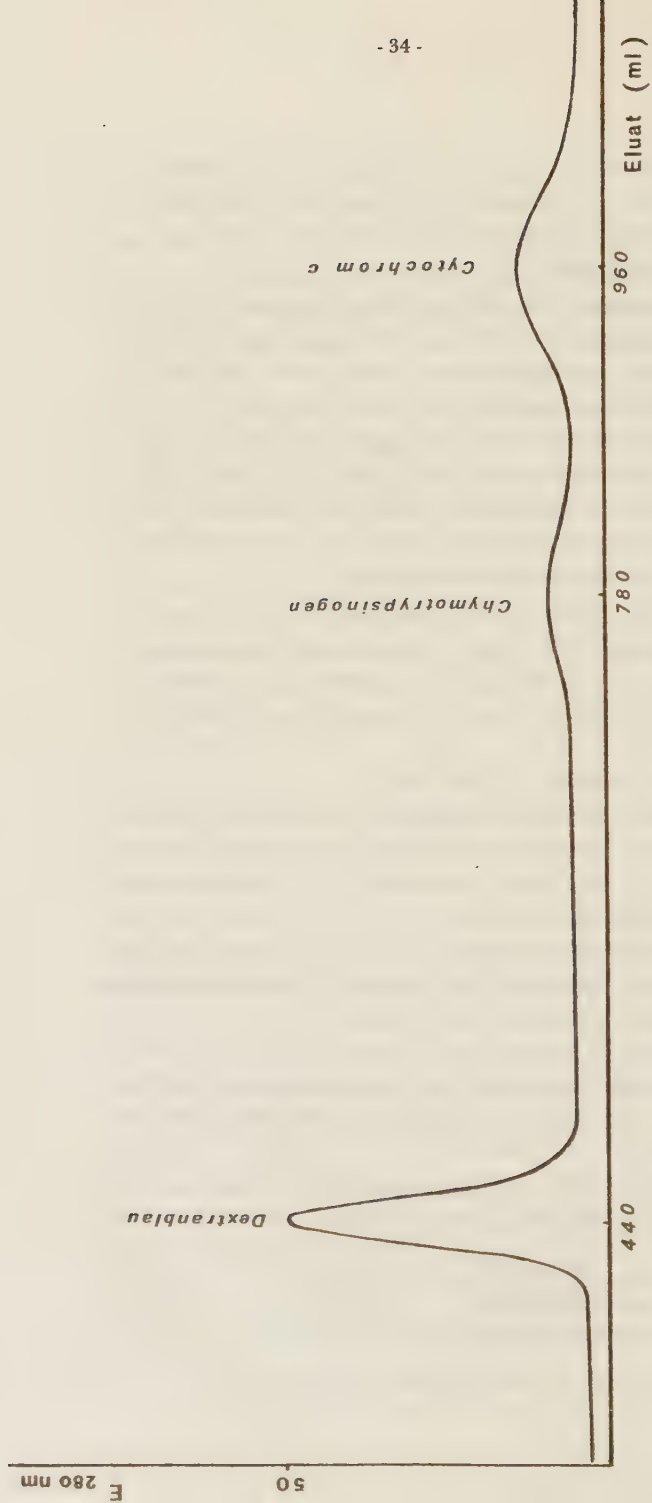
Zur Erstellung einer Eichkurve wurden außerdem noch zwei Substanzen mit bekanntem MW zugegeben - Chymotrypsinogen, MW 24 000 und Cytochrom c MW 13 000.

Am Schreiber des Durchlaufphotometers konnten die jeweiligen Absorptionsmaxima bei 280 nm abgelesen und durch Auszählen einer bestimmten Reagenzglasnummer zugeordnet werden.

Danach wurden die Absorptionsmaxima durch Ausmessen einem bestimmten Elutionsvolumen zugeordnet.

Dextranblau	V_0 = 440 ml
Chymotrypsinogen	V = 780 ml
Cytochrom c	V = 960 ml

Elutionskurve der Eichsubstanzen siehe Abb. 6.



Elutionskurve der Eichsubstanzen

Abb. 6

Das antitryptische Aktivitätsmaximum des physiologischen TI im RS lag bei einem Elutionsvolumen von 540 ml. Das entspricht einem MW von ca. 39 000.

Erstellung der Eichkurve zur Bestimmung des MW

Dextranblau	$V_0 = 440 \text{ ml}$	
Chymotrypsinogen (MW 24 000)	$V = 780 \text{ ml}$	$\frac{V}{V_0} = 1,77$
Cytochrom c (MW 13 000)	$V = 960 \text{ ml}$	$\frac{V}{V_0} = 2,18$
physiologischer TI im RS	$V = 540 \text{ ml}$	$\frac{V}{V_0} = 1,22$

Eichkurve siehe Abb. 2

Elutionskurve des physiologischen TI im RS siehe
Abb. 1

2. Freisetzung des Trypsin aktivierten Inhibitors (TAI)

Das bei der Zentrifugation abgetrennte Sediment wurde in ca. 20 l aqua dest. aufgeschlämmt und mit konzentrierter NaOH (5 n) auf pH 8 titriert.

Dann wurden 1 g Trypsin pro 5 l Lösung eingerührt und 60 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Die Reaktion wurde mit 60 ml Perchlorsäure (70 %) pro Liter Lösung gestoppt. Dazu wurde die Säure gleichmäßig eingerührt, wobei sich sofort ein weißer Proteinniederschlag bildete. Das ausgefällte Eiweiß wurde durch 15 minütige Zentrifugation bei 3000 RPM vollständig abgetrennt und verworfen.

3. Isolierung des TAI

Der klare Überstand wurde mit starker KOH neutralisiert (auf pH 6 titriert) und im Unterdruckrotationsverdampfer auf ca. 1,5 l eingengt.

Die konzentrierte, sehr salzhaltige Lösung wurde nun zur Entsalzung auf eine Biogel p - 2 enthaltende, zylindrische Glassäule 5 x 35 cm aufgetragen. Biogel p - 2 besitzt die Eigenschaft, Salz verzögert zu eluieren.

Als Elutionspuffer verwendeten wir wieder aqua dest. Auf die Biogelsäule konnten pro Lauf 100 ml Lösung aufgetragen werden. Ein Fraktomat verteilte das Eluat auf Reagenzgläser zu je 10 ml. Der TAI wurde durch Trypsinhemmtest lokalisiert und anschließend mit AgNO_3 auf Salzgehalt überprüft. Einsatzmengen waren jeweils 20 μl , um möglichst wenig Substanz zu verlieren. Nach ca. 4 Stunden war die Säule jeweils wieder salzfrei.

Die Glasinhalte mit maximaler Hemmaktivität aus allen 15 Entsalzungsläufen wurden in Rundkolben vereinigt und im gekühlten Methanolbad (mit Trockeneis) unter Drehen eingefroren. Zum Lyophilisieren wurden die Kolben ca. 2 Tage an die Gefriertrocknungsanlage angeschlossen.

Die Trockensubstanz wurde in Boratpuffer gelöst (jeweils 25 mg in 100 ml) und in Proben zu 50 ml zum Reinigen und Auftrennen nach MW auf eine Sephadex G 75 - Säule aufgetragen. Nach dem Vorlauf (er enthält nur Elutionspuffer) wurde die Säule an den Uvicord mit Schreiber und den Fraktomaten angeschlossen. Der TAI wurde wie beim Entsalzungsschritt durch Trypsinhemmtest lokalisiert.

Wir erhielten dabei als Gesamtmenge aus allen Trennläufen etwa 800 ml Eluat mit ausreichender Hemmaktivität gegen Trypsin.

Durch Druckdialyse - wie in I. 2. beschrieben - wurde das Volumen der gereinigten TAI - Lösung auf die Hälfte eingeengt. Die darin enthaltene TAI - Menge wurde zu ca. 360 000 mIU errechnet.

Dazu wurden 100 μ l entnommen und 1 : 10 mit aqua dest. verdünnt. Davon wurden 50 μ l in den Trypsinhemmtest eingesetzt.

Leerwert LW = 70

Testwert TW = 40

LW - TW = 30

Berechnung der Aktivität

$$\frac{30}{6,6} \cdot 20 \cdot 10 = 900 \text{ mIU} / \text{ml Inhibitorlösung}$$

bei ca. 400 ml ergeben sich etwa 360 000 mIU

Zur Reindarstellung wurde der TAI durch Bindung an Trypsin-
singel aus der Lösung extrahiert.

Herstellung des Trypsinsingels

30 g CNBr aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) wurden in aqua dest. aufgequellt, dann auf der Nutsche mit 10^{-3} M HCl - Lösung gewaschen (200 ml pro 1 g Sepharose 4B).

Das an die Sepharose 4B zu bindende TPCK - Trypsin (1 g) wurde in 500 ml Puffer (0,1 m NaHCO_3 und 0,5 m NaCl) gelöst.

Die Lösung wurde mit dem Magnetrührer 2 Stunden mit dem Gel gemischt und anschließend im Trypsinhemmtest auf freies Trypsin überprüft, um mögliche Fehler auszuschließen.

Zur Absättigung der restlichen aktiven Gruppen wurde 1 m Äthanolaminlösung (10 ml pro g Gel) zugefügt und 2 Stunden eingerührt. Abschließend wurde das Trypsingel auf der Nutsche abwechselnd 20 mal mit saurem (0,1 m Natriumacetat, 0,1 m NaCl pH 4) und basischem Puffer (0,1 m Natriumtetraborat, 0,1 m NaCl pH 8) gewaschen.

Funktionsprinzip des Trypsingels:

Komplexbildung des freien Trypsininhibitors mit dem an das Gel gebundenen Trypsin und anschließende Ablösung vom Trypsingel mit KCl - Lösung bei saurem pH. Man erhält auf diese Weise einen hohen Reinheitsgrad der Inhibitorlösung.

In das gewaschene Trypsingel wurde mit einem Magnetrührer die eingeengte Inhibitorlösung ca. 1 Stunde eingerührt. Um festzustellen, ob die gesamte Inhibitor- menge an das Trypsingel gebunden wurde, entnahmen wir 0,1 ml, filterten und verdünnten die Probe 1 : 10 mit aqua dest. und setzten 50 µl davon in den Trypsinhemm- test ein. Die Berechnung ergab, daß im ersten Extrak- tionsschritt etwa zwei Drittel der Inhibitor- menge an das Trypsingel gebunden wurde. Die freie Inhibitorlö- sung wurde deshalb auf der Nutsche vom Trypsingel-In- hibitor-Komplex getrennt und dem gleichen Arbeitsgang noch einmal unterworfen.

Inzwischen lösten wir die gebundene Inhibitor- menge von der Trypsin - Sepharose mit einer 0,3 m KCl - Lö- sung vom pH 2 und filterten die Inhibitorlösung auf der Nutsche ab. Dieser Vorgang wurde wiederholt, um evtl. nicht abgelöste Restmengen des Inhibitors noch

zu eluieren. Anschließend wurde das Trypsingel mit einem Waschpuffer vom pH 8 (0,2 m Triäthanolamin, 1 m NaCl) gereinigt und mit dem verbliebenen Drittel der Inhibitorgesamtmenge verrührt. Die Lösung wurde wie im vorangegangenen Extraktionsschritt getestet. Dabei ergab sich, daß fast die gesamte verbliebene Inhibitormenge an das Trypsingel gebunden wurde. Die Ablösung des Inhibitors von der Trypsin-Sepharose wurde wie im oben beschriebenen ersten Extraktionsschritt durchgeführt.

Die gereinigte, aber jetzt sehr salzhaltige und saure TI - Lösung wurde mit NaOH neutralisiert (auf pH 6, dem pH - Optimum des TAI). Im Zuge der Entsalzung wurde die Lösung gefiltert und durch Ultrafiltration auf ca. 20 ml eingeengt und partiell entsalzt.

Dieses Konzentrat wurde zur weiteren Entsalzung in 2 Proben zu je 10 ml auf die Biogel p - 2 Säule 3 x 30 cm aufgetragen. Als Elutionspuffer verwendeten wir Pyridin - Collidin - Lösung mit pH 8,4. Nach der Fraktionierung des Eluates wurde der TAI durch Trypsinhemmtest lokalisiert und mit AgNO_3 gegen den Beginn des salzhaltigen Eluates abgegrenzt.

Die salzfreie TAI - Lösung wurde in 100 ml Kolben an der Rotationsdestille eingedampft und anschließend in ca. 10 ml aqua dest. gelöst.

Im gekühlten Methanolbad wurde der Inhalt der 100 ml Kölbchen an der Glaswand eingefroren und anschließend lyophilisiert.

Wir erhielten eine Gesamtmasse des TAI von 220 mg.

Um Verunreinigungen durch Bruchstücke des Trypsingels auszuschließen, wurde die Trockenmasse in 30 ml Elutionspuffer gelöst und noch einmal der Gelfiltration unterworfen.

Derjenige Teil des Eluates, der den TAI enthielt, wurde erneut durch Druckdialyse eingeengt und auf der Biogel - Säule entsalzt, um schließlich nach dem Eindampfen, Lösen und Einfrieren wieder lyophilisiert zu werden.

Zur Bestimmung des MW des TAI wurden ein paar mg Trockenmasse in 10 ml Boratpuffer gelöst und auf die geeichte Sephadex G 75 - Säule aufgetragen. Dabei wurde wie bei der Bestimmung des MW des physiologischen TI verfahren.

Das antitryptische Aktivitätsmaximum des TAI im RS lag bei einem Elutionsvolumen von 800 ml. In der Eichkurve (Abb. 4) konnte dem TAI im RS ein MW von etwa 22 000 zugeordnet werden.

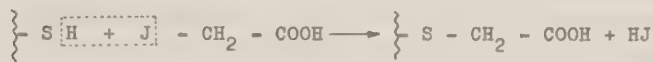
Trypsin aktivierter Trypsininhibitor im RS (TAI)

$$V = 800 \text{ ml}, \frac{V}{V_0} = 1,82 \quad \hat{=} \text{ MW } 22 \text{ 000}$$

Elutionskurve des TAI siehe Abb. 3

4. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des TAI

Um den Trypsininhibitor tryptisch spalten zu können, mußte erst seine Tertiärstruktur zerstört werden. Dazu war es nötig, die Schwefelbrücken im Cystin aufzubrechen und durch Reduktion des Schwefels eine Restitution zu verhindern. Hierzu wurde 6 m Harnstoff und 2 m Merkaptoäthanol als Reduktionsmittel verwendet. Nach 2 Stunden wurden die SH - Gruppen mit Jodessigsäure carboxymethyliert.



Nach Entsalzung auf der Biogel p - 2 - Säule wurde das salzfreie Eluat eingedampft und schließlich für die Spaltung mit Trypsin in aqua dest. gelöst.

Nach der Zugabe des Trypsins wurde 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde das denaturierte Inhibitorprotein hinter den Aminosäuren Lysin und Arginin in sog. tryptische Peptide gespalten.

Auf einer Ionenaustauschersäule (Dowex 1 x 2) wurden die Peptide durch einen Puffergradienten von Pyridin-Collidin pH 8,4 nach Essigsäure pH 5,4 getrennt eluiert. Hier wurden die basischen Peptide zuerst eluiert.

Aus jedem Reagenzglas wurden 100 µl entnommen und jeweils 500 µl 2,5 n NaOH hinzugegeben.

Die Proben wurden zur Hydrolyse der Aminosäuren 45 Minuten in kochendes Wasser gestellt und anschließend mit je 500 µl 30 %iger Essigsäure neutralisiert.

Um festzustellen, in welchen Gläsern sich Aminosäuren befanden, wurden die Proben 20 Minuten mit Ninhydrin-Reagenz angefärbt (1 ml pro Glas).

In jedes Glas, das Aminosäuren enthielt (blau gefärbter Inhalt), wurden 5 ml Propanol (1 : 1 mit H₂O verdünnt) gegeben und geschüttelt.

Zur Bestimmung der Absorption wurde das Photometer mit

einem Filter für die Wellenlänge 578 nm mit Hilfe einer wassergefüllten Küvette ($d = 1$ cm) auf 0 geeicht. Zur Extinktionsbestimmung wurde von jeder Probe 3 ml eingesetzt. Die Extinktionsänderung war ein Maß für den Gehalt an Aminosäuren.

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der verschiedenen Peptide wurde nach saurer Hydrolyse nach bekannten Methoden am Beckman Unichrom Aminosäureanalysator durchgeführt. Die qualitative und quantitative Aufschlüsselung der in den einzelnen Peptiden enthaltenen Aminosäuren ist in den Tabellen 1 - 4 ersichtlich. Die angegebenen Werte sind relative Molmengen, bezogen auf Arginin oder Lysin. Da Trypsin hinter den Aminosäuren Arg und Lys spaltet, kann in jedem Peptid Arg oder Lys als Bezugsgröße 1 gewählt werden. Die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Peptide sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Gesamtsequenz (Domain I und II) ist in Abb. 5 erfaßt.

G. LITERATURVERZEICHNIS

1. Vogel, Trautschold, Werle Natürl. Proteinaseinhibitoren (1966) Thieme Verlag
2. Hochstraßer, Feuth, Kemkes, Fall & Werle (1974)
Klin. Wochenschrift 52, 1018 - 1020
3. Hochstraßer, Feuth, Fall & Kemkes (1974)
Klin. Wochenschrift 52, 1015 - 1017
4. Hochstraßer, Feuth & Steiner (1973) Z. Physiol.
Chem. 354, 927 - 932
5. Hochstraßer, Reichert, Schwarz & Werle (1972)
Z. Physiol. Chem. 353, 221 - 226
6. Hochstraßer, Reichert, Heimbürger (1973) Z. Physiol.
Chem. 354, 587 - 588
7. Fritz, Fink, Gebhardt, Hochstraßer (1969) Z. Physiol.
Chem. 350, 933 - 950
8. Heide, Heimbürger, Haupt (1965) Clin. Chim. Acta 11
82 - 85
9. Heimbürger, Haupt, Schwick (1970) in Proceedings of the
1st Research Conference ... de Gruyter
10. Hochstraßer, Feuth, Hochgesand (1974) in Bayer Symposium V,
Springer Verlag
11. Haendle, Ingrisch, Werle (1970) Z. Physiol. Chem. 351,
545
12. Schumacher in Proceedings of ... S. 253 (1970)
de Gruyter
13. Schumacher, Zaneveld in Bayer Symposium V S. 178 (1974)
Springer Verlag
14. Haendle, Fritz, Trautschold, Werle (1965) Z. Physiol.
Chem. 343, 185
15. Finkenstadt et al in Bayer Symposium V S. 389 (1974)
Springer Verlag
16. Laskowski sr. et al in Proceedings of ... S. 70 ff.
(1970) de Gruyter
17. Laskowski jr. in The Enzymes 3rd edition (1971)
Academ. Press

18. Laskowski sr., Wu (1953) J. Biol. Chem. 204, 797
19. Kaller H. in: Neue Aspekte der Trasyolol Therapie
Hrsg. Grosser u. Kroneberg, Schattauer Verlag,
Stuttgart (1966)
20. Shulman (1955) J. Biol. Chem. 213, 655 - 671
21. Hochstraßer, Reichert, Schwarz & Werle (1973)
Z. Physiol. Chem. 923 - 926
22. Astrup, Alkajaer, Soardi (1959) Scan. J. Clin. Lab.
Invest. 11, 181 - 184
23. Proksch & Routh (1972) J. Lab. Clin. Med. 79,
491 - 499
24. Proksch & Nordschow (1972) Intersoc. 261
25. Laskowski jr. et al (1951) J. Biol. Chem. 190, 563
26. Laskowski jr. et al (1952) J. Biol. Chem. 198, 745
27. Čechova, Svestkova, Keil, Šorm (1969) FEBS Letters 4,
155
28. Čechova, Jonakova, Šorm in Proceedings of ...
S. 105 - 107 (1970) de Gruyter
29. Feuth, Kemkes & Hochstraßer (1975) Langenbecks Arch.
Chir. Suppl. Chir. Forum, 133 - 136
30. Hochstraßer & Feuth (1976) in Protides of the Biol.
Fluids, 23rd Colloquium, Pergamon Press
31. Steinbuch, Lambin, Audran & Fine (1975) in Prot. of
the Biol. Fluids, 23rd Colloquium (Peeters, ed.)
Pergamon Press
32. Hochstraßer, Bretzel, Feuth, Hilla & Lempart (1976)
Z. Physiol. Chem. 357, 153 - 162
33. Bretzel, Hochstraßer (1976) Z. Physiol. Chem. 357,
487 - 489
34. Fritz, Trautschold & Werle (1970) in Methoden d.
Enzymat. Analyse (Bergmeyer, ed.) 1221 - 1232
Verlag Chemie, Weinheim
35. Green & Work (1953) Biochem. J. 54, 347 - 352
36. Reichenbach - Klinke, Meckl, Kemkes, Hochstraßer,
Fritz & Werle (1969) Arzneim.-Forsch. 19, 1025

37. Fritz, Oppitz, Meckl, Kemkes, Haendle, Schult & Werle (1969) Z. Physiol. Chem. 350, 1541 - 1550
38. Werle E. in: Proceedings of the 1st Research Conference S. 23 ff (1970) de Gruyter
39. Hochstraßer K. noch nicht veröffentlicht

Lebenslauf

5. Febr. 1949 geboren in Titlmoos (Lkr. Rosenheim) als
Sohn der Eheleute Sebastian Thaler und
Maria Thaler, geb. Wolfswinkler
- 1955 - 1962 Besuch der Volksschule Waldhausen
- 1962 - 1966 Realschule Wasserburg a. Inn
- 1966 - 1970 math. naturw. Zweig des Gymnasiums
Pfarrkirchen
20. Juni 1970 Abitur erfolgreich abgelegt
- WS 1970/71 - Maschinenbaustudium an der TU München
WS 1972/73
25. Sept. 1971 Heirat mit Elisabeth Gabriele Thaler,
geb. Roither
- WS 1972/73 Vordiplom Maschinenbau mit Erfolg ab-
geschlossen
- SS 1973 - Vorklinisches Studium der Zahnmedizin
WS 1974/75
- März 1975 Physikum mit Erfolg abgelegt
- SS 1975 - Klinisches Studium der Zahnmedizin
WS 1977/78
- WS 1977/78 Staatsexamen in der Zahnmedizin

